

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y INDUCIDA CON ÁCIDO RETINOICO



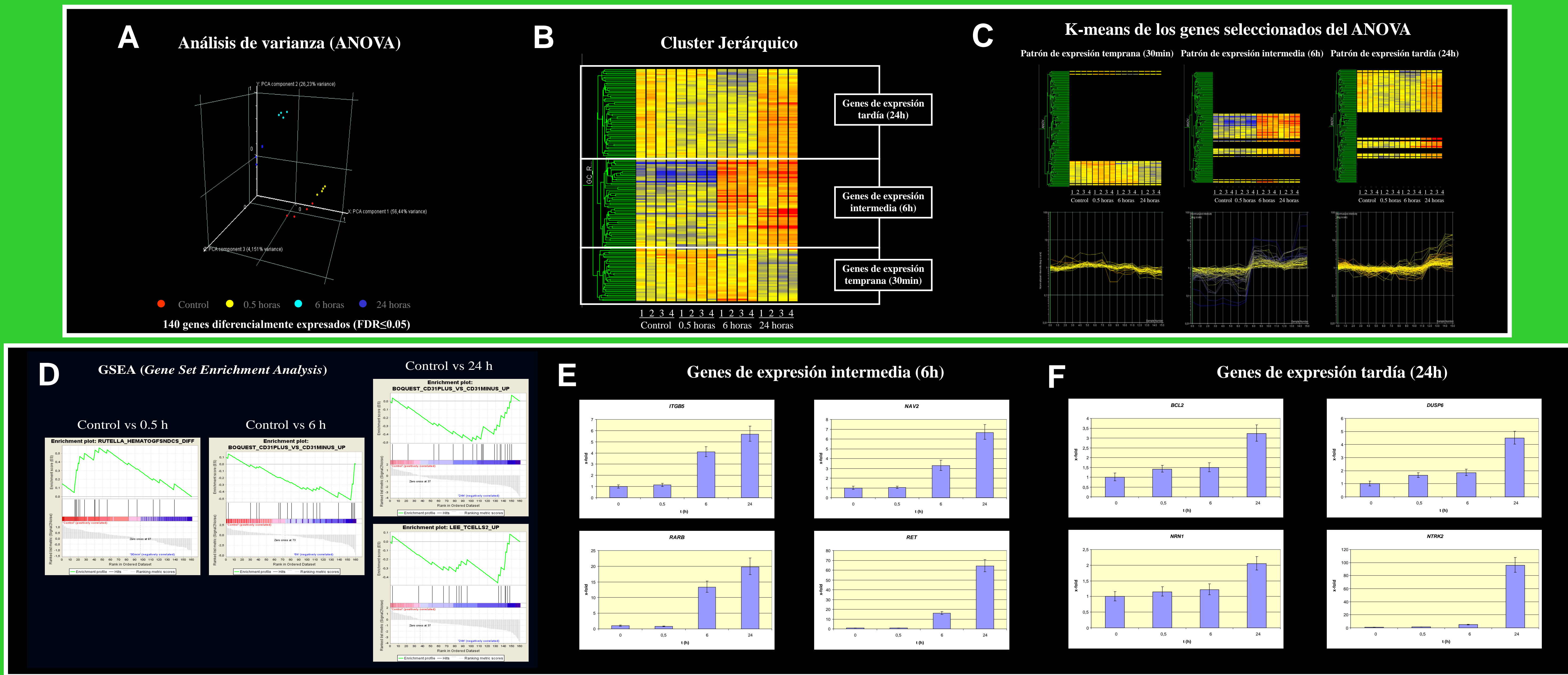
Salvador Meseguer, Nuria Ruiz y Domingo Barettino

Unidad de Biología de la Acción Hormonal. Departamento de Patología y Terapia Molecular y Celular. Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC). Jaume Roig, 11. 46410 Valencia (España).

El Ácido Retinoico (RA) actúa como molécula reguladora en la diferenciación de las células SH-SY5Y. En este proceso de diferenciación inducida por RA se ponen en marcha no sólo mecanismos genómicos sino también mecanismos extra-genómicos de acción rápida. Concretamente se han identificado la activación rápida de la ruta de señalización de la PI3K/AKT, una activación que resulta ser necesaria para la inducción de la diferenciación neuronal y que tiene lugar a través de la interacción del Receptor del Ácido Retinoico (RAR) con la subunidad reguladora de la PI3K (López-Carballo G. et al., J. Biol. Chem. 277, 25297-25304, 2002; Masiá S. et al., Mol Endocrinol. 21(10): 2391-402, 2007). Los cambios en la expresión génica producidos por integración de mecanismos de acción del RA tanto genómicos como extra-genómicos han sido estudiados mediante la tecnología de microarrays. Durante este proceso de diferenciación de las células SH-SY5Y con RA, hemos identificado 140 genes distribuidos en tres patrones de expresión génica claramente definidos: genes de expresión rápida, mediana y tardía. El análisis funcional de los genes de cada patrón revelan que: los genes de expresión rápida participan especialmente en procesos de procesamiento de RNA y de apoptosis, los de expresión intermedia están implicados principalmente en procesos de desarrollo, diferenciación y metabolismo del RA, y finalmente los genes de expresión tardía participan fundamentalmente en metabolismo, especialmente de lípidos y en quimiotaxis.

Con el objetivo de establecer posibles puntos de interacción entre la activación de vías de señal por RA (acciones extra-genómicas del RA) y la activación transcripcional regulada por los receptores de RA (acciones genómicas) se ha estudiado el efecto de los inhibidores de las principales rutas de señalización sobre la expresión génica. Concretamente, este estudio nos ha permitido identificar que la activación de la PI3K/AKT ejerce un efecto inhibitorio en la expresión de algunos genes de expresión intermedia y tardía, entre ellos, *RARB*. Finalmente, para obtener una visión más completa de todos los mecanismos de regulación que desencadena el Ácido Retinoico durante la diferenciación neuronal, hemos iniciado el estudio de la expresión de microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son moléculas pequeñas (18-22 nt) de cadena sencilla no codificantes que regulan la traducción de genes específicos. Estas moléculas se expresan de forma diferencial en distintos tejidos y momentos del desarrollo, y controlan procesos en la célula como proliferación, diferenciación y apoptosis. Por este motivo es importante analizar los cambios de expresión de estas moléculas durante la diferenciación neuronal inducida por Ácido Retinoico, y tratar de identificar sus genes diana. En un estudio preliminar con un panel de miRNAs seleccionados hemos identificado un grupo de 5 miRNAs inducidos por RA.

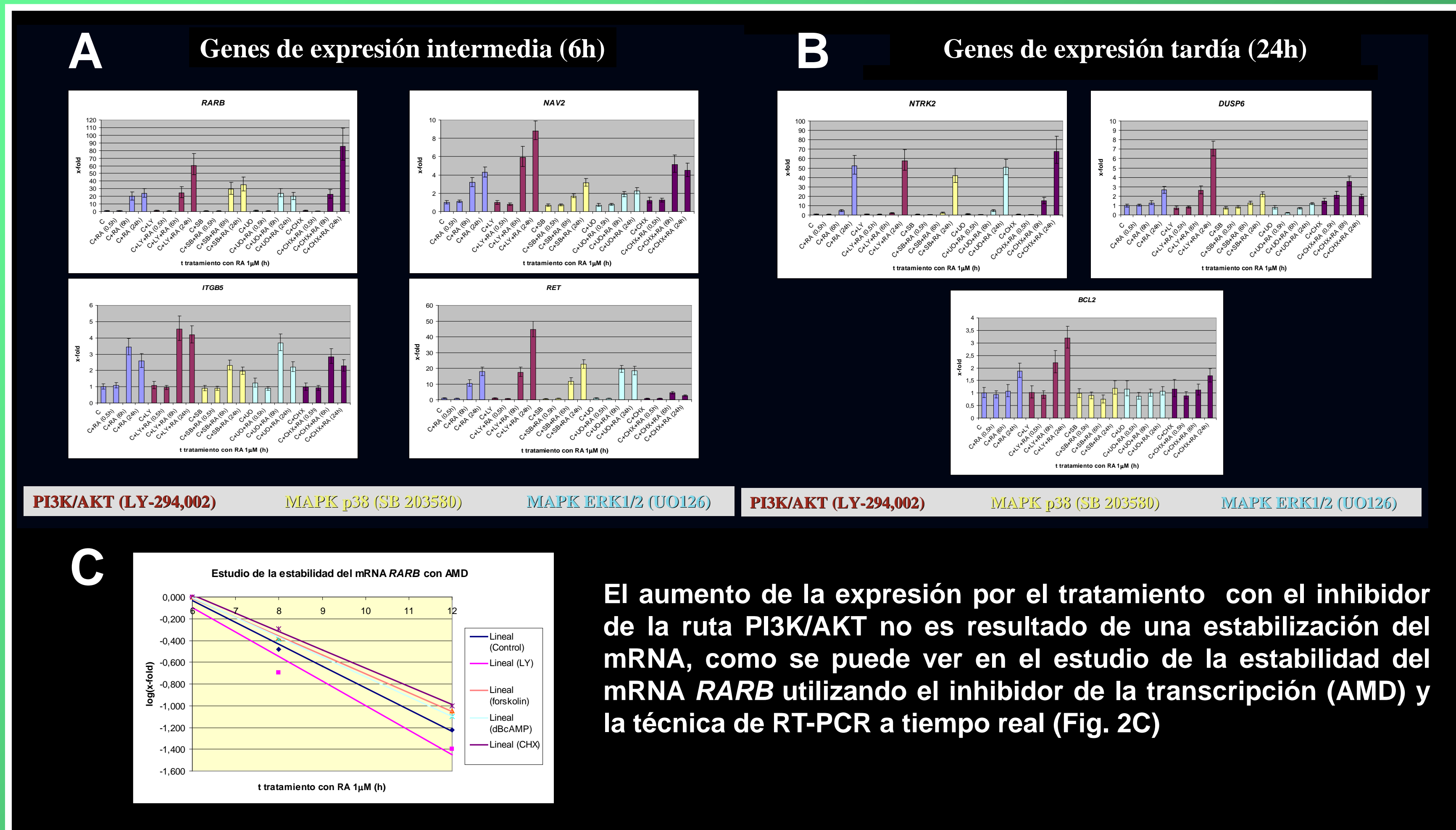
1. Análisis de los microarrays con GeneSpring GX (versión 7.3.1).



Para elucidar los efectos del RA sobre la expresión génica, se analizaron los niveles de expresión de 14.500 genes en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas con RA 1 μ M durante 0,5, 6 y 24 h, utilizando la plataforma de microarrays Human Genome U133A 2.0 de Affymetrix. Los datos obtenidos se analizaron con el programa GeneSpring GX 7.3.1. Tras realizar un análisis de varianza (ANOVA) se seleccionaron 140 genes expresados diferencialmente con un valor $FDR \leq 0.05$. Mediante un análisis de componentes principales (PCA) se confirmó el comportamiento similar de los 140 genes entre las cuatro réplicas de cada condición, así como la presencia de diferencias entre las distintas condiciones, especialmente entre el control y 0,5 horas, y las 6 y 24 horas (Fig.1A). Posteriormente, se procedió a identificar posibles patrones de expresión, sometiendo este grupo a dos tipos de cluster, Jerárquico y K-means. En el análisis de cluster jerárquico (Fig.1B), el árbol mostró tres patrones de genes expresados diferencialmente: genes con una expresión a las 24 horas de tratamiento con RA (genes de expresión tardía), genes con una expresión a las 6 horas de tratamiento (genes de expresión intermedia) y genes con una expresión rápida, a los 30 minutos de tratamiento (genes de expresión temprana). Con un agrupamiento por K-means de 3 clusters se comprobó que los perfiles de expresión de los genes contenidos en cada uno de los clusters se ajustaban bien a un mismo patrón de expresión y éstos se correspondían con las regiones identificadas en el árbol jerárquico (Fig. 1C). Los genes contenidos en cada uno de los patrones fueron descritos funcionalmente, utilizando la base de datos del Gene Ontology, así como la herramienta GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Según la base de datos del Gene Ontology, los genes de expresión rápida participan especialmente en procesos de procesamiento de RNA y apoptosis, los de expresión intermedia están implicados principalmente en procesos de desarrollo, diferenciación y metabolismo del RA, y finalmente los genes de expresión tardía participan fundamentalmente en metabolismo, especialmente de lípidos y en quimiotaxis. La herramienta GSEA nos permitió identificar grupos de genes descritos en distintos procesos funcionales que presentan diferencias estadísticamente significativas al comparar dos condiciones de tratamiento (Fig. 1D). Finalmente, se seleccionaron un grupo de genes de cada patrón y se validaron por RT-PCR a tiempo real (Fig. 1E y 1F).

2. Estudio de posibles interacciones entre la activación de vías de señal por RA (acciones extra-genómicas del RA) y la activación transcripcional asistida por RAR (acciones genómicas).

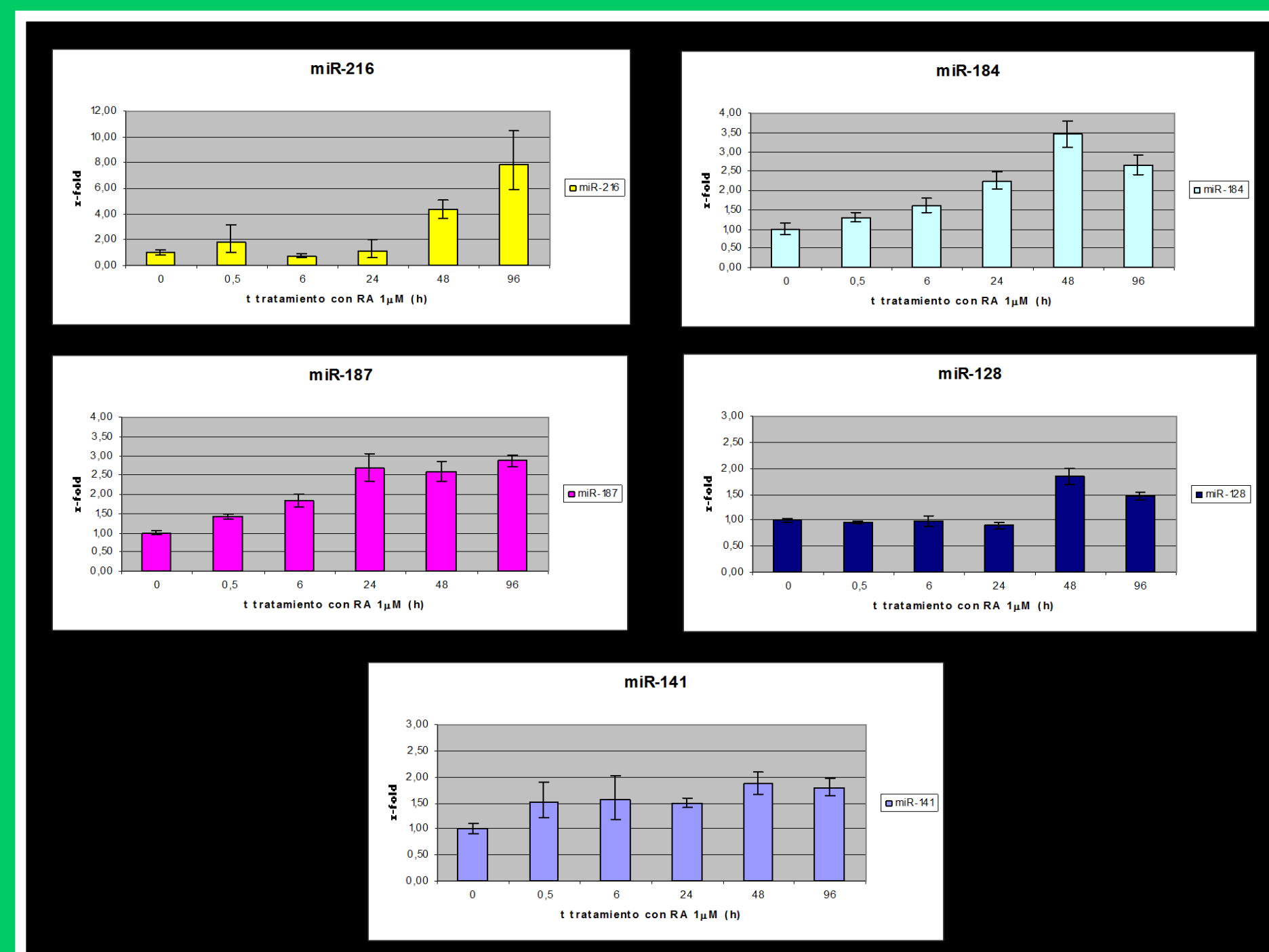
En una primera aproximación, se examinó el efecto de los inhibidores de distintas rutas de señalización (PI3K/AKT (LY-294,002), MAPK p38 (SB 203580) y MAPK ERK1/2 (UO126)) sobre la expresión regulada por los receptores nucleares del RA de algunos de los genes utilizados en la validación. La inhibición de la ruta PI3K/AKT nuclea a un aumento notable de la expresión a las 6h y 24h de tratamiento con RA para la mayoría de los genes, sugiriendo que la activación de la PI3K/AKT participa activamente en la regulación negativa de éstos (Fig.2A y 2B). Este efecto inhibitorio de la expresión podría justificarse por fosforilación de algún componente transcripcional como podría ser el propio receptor o algún co-regulador.



El aumento de la expresión por el tratamiento con el inhibidor de la ruta PI3K/AKT no es resultado de una estabilización del mRNA, como se puede ver en el estudio de la estabilidad del mRNA *RARB* con el estudio de la transcripción (AMD) y la técnica de RT-PCR a tiempo real (Fig. 2C)

3. Estudio de la expresión de microRNAs durante la diferenciación de células SH-SY5Y inducida por RA.

El estudio consistió en analizar la expresión de un panel de miRNAs durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por RA, mediante RT-PCR cuantitativa. En este grupo se incluyeron miRNAs cuya expresión está descrita en tumores primarios de neuroblastoma y que además se sobre-expresan durante la diferenciación inducida por RA en otras líneas celulares de neuroblastoma (miR-21, -34a, -141, -184, -187, -216) (Chen et al., Cancer Res. 67, 976-984, 2007; Welch et al., Oncogene 26, 5017-5022, 2007). Además se incluyeron miRNAs cuya expresión es específica o está enriquecida en el sistema nervioso (miR-9, -100, -124a, -128) (Sempere et al., Genome Biology 5:R13, 2004). De todo el conjunto, se identificaron 5 miRNAs cuya expresión se ve incrementada durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por RA.



Agradecimientos: S Meseguer es becario predoctoral I3P-CSIC, N Ruiz es técnico titulado superior de investigación I3P-CSIC. Financiado por el Plan Nacional de I+D+i, P. N. de Biomedicina (proyectos SAF2006-00647 y SAF2007-60780).